

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①⑪ N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 818 662

②① N° d'enregistrement national : **00 16940**

⑤① Int Cl⁷ : C 12 Q 1/68, G 01 N 33/543

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 22.12.00.

③⑦ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 28.06.02 Bulletin 02/26.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATO-
MIQUE Etablissement de caractère scientifique techni-
que et industriel — FR.

⑦② Inventeur(s) : VINET FRANCOISE et HOANG
ANTOINE.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : BREVATOME.

⑤④ PROCÉDE D'IMMOBILISATION DE SONDÉS, EN PARTICULIER POUR RÉALISER DES PUCES
BIOLOGIQUES.

⑤⑦ L'invention concerne un support solide comportant
des sites destinés à l'immobilisation de sondes oligonucléo-
tidiques, les sites étant pourvus d'espèces chimiques accro-
chées au support par une fonction chimique d'accrochage.
Les espèces chimiques présentent un groupe diol obtenu à
partir d'un précurseur époxyde dépourvu d'atome d'oxygène
en position β du diol vicinal. L'oxydation du diol permet
d'obtenir un groupe aldéhyde.
Application aux biopuces.

FR 2 818 662 - A1



**PROCEDE D'IMMOBILISATION DE SONDAS, EN PARTICULIER POUR
REALISER DES PUCES BIOLOGIQUES**

DESCRIPTION

5 DOMAINE TECHNIQUE

L'invention concerne un procédé d'immobilisation de sondes en particulier pour réaliser des puces biologiques. Elle permet la fabrication de biopuces à oligonucléotides dont le greffage sur un support solide est réalisé par l'intermédiaire d'une liaison covalente.

ETAT DE LA TECHNIQUE ANTERIEURE

Les biopuces peuvent être réalisées par synthèse parallèle d'oligonucléotides directement sur un support solide. Dans ce cas, il existe une limitation du procédé liée à la pureté des sondes synthétisées. En effet, aucune purification après synthèse n'est possible. Ceci engendre la présence sur le support solide de séquences tronquées de longueur (n-1) mères pour une longueur visée de n. Cette technique est adaptée à des puces de haute densité (supérieure à 1000 sondes), dont les sondes ont une longueur comprise entre 6 et 20 mères. Les applications visées dans ce cas, sont le séquençage et le criblage (ou "screening" en anglais) du polymorphisme simple de nucléotide (SNP).

Une autre voie est l'immobilisation de sondes. Dans ce cas, les sondes sont présynthétisées et peuvent donc être purifiées. Deux types d'immobilisation de sondes oligonucléotides se

présentent. Une sonde purifiée peut être fixée sur un support solide soit par adsorption, soit par greffage via une réaction spécifique entre la sonde et le support.

5 L'adsorption de la sonde sur le support est un phénomène passif puisque des liaisons de type électrostatique établies entre le squelette phosphodiester de la sonde chargée négativement et le support modifié portant des charges positives
10 interviennent de façon non covalente dans l'immobilisation de la sonde. Ce type d'immobilisation est compatible avec des longueurs de sondes comprises entre 70 et quelques centaines de mères.

Par contre, dans le cas d'un greffage de la
15 sonde par réaction spécifique, le phénomène est dit actif, car il est dû à la réactivité et à la spécificité entre la fonction branchée sur la sonde et celle introduite sur le support solide. Ce mode d'immobilisation établit par conséquent des liaisons de
20 type covalent entre la sonde déposée et le support utilisé. Il est compatible avec des longueurs de sondes comprises entre 6 et 50 à 60 mères.

L'immobilisation de sondes oligonucléotidiques met en œuvre un couple de fonctions chimiques
25 branchées sur la sonde et le support. Cette notion de couple de fonctions chimiques s'appuie sur la réactivité entre un nucléophile et un électrophile.

Il existe donc plusieurs possibilités de fonctionnalisation, c'est-à-dire d'apport des fonctions
30 chimiques sur la sonde et sur le support. On peut ainsi utiliser une sonde nucléophile sur un support

électrophile, une sonde électrophile sur un support nucléophile, une sonde nucléophile sur un support également nucléophile mais en présence d'un bras di-électrophile, et une sonde électrophile sur un support également électrophile mais en présence d'un bras di-nucléophile.

Les sondes rendues nucléophiles par une fonction amine sont les plus répandues. En effet, cette fonction est stable et est très accessible commercialement.

Différentes étapes sont nécessaires à l'obtention des plots fluorescents correspondant aux hybridons, produits issus de l'appariement entre deux simples brins d'ADN complémentaires.

L'obtention d'un support fonctionnalisé pour biopuce à immobilisation de sondes nécessite 3 étapes principales :

- le nettoyage de la surface du support devant présenter les sites réactifs,
- la silanisation de cette surface,
- l'activation des sites.

Ces étapes sont suivies de 3 autres étapes qui vont conduire à l'acquisition des signaux de fluorescence :

- l'immobilisation des sondes sur les sites,
- l'hybridation des sondes,
- la lecture.

On distingue principalement deux voies d'introduction de sites d'ancrage des sondes sur le support à partir desquels des fonctions chimiques

seront créées ultérieurement. Ces sites sont soit nucléophiles, soit électrophiles. Ils sont apportés lors de l'étape de silanisation.

5 A titre d'exemple, la figure 1 représente un site nucléophile constitué par une fonction amine rattachée à un support par un silane et la figure 2 représente un site électrophile constitué par une fonction époxyde rattachée à un support par un silane.

10 Des supports pour biopuces actuellement disponibles présentent des sites électrophiles par apport d'une fonction aldéhyde. Ils permettent l'accrochage des sondes rendues nucléophiles par une fonction amine.

15 La figure 3 représente un schéma d'obtention d'une fonction aldéhyde sur un support solide à partir d'une fonction amine couplée avec un bras dialdéhyde.

20 Les supports pour biopuces offrant une fonction aldéhyde et actuellement connus présentent les inconvénients suivants.

Ils nécessitent un intermédiaire de couplage (voir la figure 3), ce qui diminue la densité finale de sites d'accrochage des sondes.

25 Leur stockage pose problème, la forme aldéhyde étant relativement peu stable. En effet, il a été observé que les supports doivent être utilisés immédiatement après l'ouverture de la boîte qui les contient.

30 Le groupement NH_2 initialement sur le support (voir la figure 3) peut être transformé en NH_3^+ , ce qui favorise l'adsorption de composés non

spécifiques. Il en résulte une augmentation du bruit de fond des biopuces.

EXPOSÉ DE L'INVENTION

Afin d'apporter une solution aux
5 inconvénients présentés par l'art connu, il est proposé selon la présente invention d'obtenir une fonction aldéhyde (permettant l'immobilisation d'une sonde) par transformation d'un époxyde en passant par un diol.

Un premier objet de l'invention consiste en
10 un support solide constitué par un substrat comportant des sites destinés à l'immobilisation de sondes oligonucléotidiques, les sites étant pourvus d'espèces chimiques accrochées au substrat par une fonction chimique d'accrochage, caractérisé en ce que les
15 espèces chimiques présentent un groupe diol obtenu à partir d'un précurseur époxyde dépourvu d'atome d'oxygène en position β du diol vicinal.

Un tel support présente l'avantage de pouvoir être stocké sans problème pendant six mois, la
20 forme diol étant plus stable que la forme aldéhyde.

Le substrat peut être en un matériau choisi parmi le verre, le silicium et le plastique.

De préférence, la fonction chimique d'accrochage des espèces chimiques sur le support est
25 une fonction silane.

Un deuxième objet de l'invention consiste en un support solide constitué par un substrat comportant des sites activés pour l'immobilisation de sondes oligonucléotidiques, les sites étant pourvus
30 d'espèces chimiques accrochées au substrat par une

fonction chimique d'accrochage, les espèces chimiques comportant un groupe aldéhyde destiné à l'immobilisation desdites sondes, caractérisé en ce que le groupe aldéhyde est un groupe obtenu par oxydation
5 d'un diol vicinal dépourvu d'atome d'oxygène en position β .

Le substrat peut être en un matériau choisi parmi le verre, le silicium et le plastique.

De préférence, la fonction chimique
10 d'accrochage des espèces chimiques sur le support est une fonction silane.

Un troisième objet de l'invention consiste en un support solide constitué par un substrat comportant des sites activés comme défini ci-dessus,
15 des sondes oligonucléotidiques étant immobilisées sur les sites activés grâce à une liaison covalente entre les fonctions aldéhyde du support solide et des fonctions amine portées par les sondes.

Un quatrième objet de l'invention consiste
20 en un procédé de fabrication d'un support solide présentant des sites destinés à l'immobilisation de sondes oligonucléotidiques, comprenant les étapes suivantes :

- nettoyage d'une surface d'un substrat,
- 25 - définition desdits sites par mise en place, sur la surface nettoyée, d'espèces chimiques accrochées au substrat par une fonction chimique d'accrochage, les espèces chimiques comportant un précurseur destiné à former une fonction aldéhyde
30 permettant l'immobilisation des sondes,

caractérisé en ce que le précurseur est une fonction époxyde et est traité pour donner un groupe diol, le précurseur époxyde étant dépourvu d'atome d'oxygène en position β du diol.

5 Avantageusement, le traitement pour donner un groupe diol est une hydrolyse acide de l'époxyde.

L'étape de nettoyage peut consister à nettoyer une surface d'un substrat en un matériau choisi parmi le verre, le silicium et le plastique.

10 De préférence, la fonction chimique d'accrochage des espèces chimiques sur le substrat est une fonction silane.

Le procédé peut comporter en outre une étape consistant à oxyder le diol pour obtenir un
15 aldéhyde.

Un cinquième objet de l'invention consiste en un procédé de fabrication d'une biopuce, comprenant :

- la fabrication d'un support solide
- 20 présentant des sites destinés à l'immobilisation de sondes oligonucléotidiques selon le procédé ci-dessus,
- l'immobilisation des sondes oligonucléotidiques par liaison covalente entre les fonctions aldéhyde du support solide et des fonctions amine (ou
- 25 oxyamine) portées par les sondes en position 5' ou 3'.

BRÈVE DESCRIPTION DES DESSINS

L'invention sera mieux comprise et d'autres avantages et particularités apparaîtront à la lecture de la description qui va suivre, donnée à titre

d'exemple non limitatif, accompagnée des dessins annexés parmi lesquels :

- la figure 1, déjà décrite, représente un site nucléophile constitué par une fonction amine
5 rattachée à un support par un silane,

- la figure 2, déjà décrite, représente un site électrophile constitué par une fonction époxyde rattachée à un support par un silane,

- la figure 3, déjà décrite, représente un
10 schéma d'obtention d'une fonction aldéhyde sur un support solide, selon l'art connu,

- la figure 4 représente un schéma d'obtention d'une fonction aldéhyde sur un support solide, selon l'invention,

15 - la figure 5 est un schéma montrant la fonction diol en position vicinale,

- la figure 6 est un schéma montrant le mécanisme de complexation du periodate de sodium sur un diol,

20 - la figure 7 est un schéma montrant la fonctionnalisation d'un substrat silanisé sans oxygène en position β du diol.

25 DESCRIPTION DETAILLEE DE MODES DE REALISATION DE L'INVENTION

La figure 4 est un schéma d'obtention d'une fonction aldéhyde sur un support solide à partir d'une fonction époxyde hydrolysée en diol puis oxydé en aldéhyde, selon l'invention. L'époxyde utilisé est par
30 exemple du glycidoxypropylépoxyde triétoxysilane.

Cependant, les inventeurs de la présente invention ont constaté qu'après les étapes de nettoyage, de silanisation, d'activation puis d'hybridation, les résultats de fluorescence des plots
5 d'hybridation sur le support sont peu encourageants. Ceci n'est pas dû à l'étape d'hybridation puisque des manipulations parallèles effectuées sur des lames commerciales et des lames aminées, ont donné de meilleures intensités de signaux.

10 Les inventeurs ont donc remis en cause, non pas les étapes de nettoyage ou de silanisation (qui sont efficaces en synthèse in situ), mais plutôt l'étape d'activation, c'est-à-dire lors de la transformation de la fonction époxyde en aldéhyde et
15 plus précisément, l'oxydation du diol vicinal du silane en aldéhyde.

La figure 5 est un schéma montrant la fonction diol en position vicinale.

Il en résulte qu'avec un époxyde sans
20 oxygène en position β du diol, l'oxydation doit avoir lieu.

La figure 6 est un schéma montrant le mécanisme de complexation du periodate de sodium sur un diol.

25 Pour vérifier leur hypothèse, les inventeurs ont utilisé un silane portant une fonction époxyde dépourvue de l'atome d'oxygène en position β .

La figure 7 est un schéma montrant la fonctionnalisation d'un substrat silanisé sans oxygène
30 en position β du diol vicinal.

Après les différentes étapes de la chaîne réactionnelle, on a obtenu des plots de fluorescence saturés sur fond noir, ce qui confirme l'hypothèse des inventeurs.

5 L'invention présente plusieurs avantages par rapport à l'état de la technique et plus particulièrement par rapport aux substrats de type aldéhyde actuellement commercialisés.

10 L'invention n'utilise pas d'intermédiaire de couplage qui diminue la densité finale de sites d'accrochage des sondes. Le signal de fluorescence obtenu est plus important dans le cas de l'invention. On observe un facteur 10 dans des conditions expérimentales identiques.

15 Comme mentionné plus haut, l'invention permet de stocker les supports solides sous la forme diol qui est particulièrement stable.

20 L'invention permet aussi de minimiser le bruit de fond des biopuces puisqu'il n'y a pas de groupement permettant des interactions électrostatiques.

La préparation des supports selon l'invention est transposable à d'autres techniques de réalisation de biopuces (synthèse in situ).

25

REVENDICATIONS

1. Support solide constitué par un substrat comportant des sites destinés à l'immobilisation de sondes oligonucléotidiques, les sites étant pourvus d'espèces chimiques accrochées au substrat par une fonction chimique d'accrochage, caractérisé en ce que les espèces chimiques présentent un groupe diol obtenu à partir d'un précurseur époxyde dépourvu d'atome d'oxygène en position β du diol vicinal.

2. Support solide selon la revendication 1, caractérisé en ce que le substrat est en un matériau choisi parmi le verre, le silicium et le plastique.

3. Support solide selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que ladite fonction chimique d'accrochage des espèces chimiques sur le support est une fonction silane.

4. Support solide constitué par un substrat comportant des sites activés pour l'immobilisation de sondes oligonucléotidiques, les sites étant pourvus d'espèces chimiques accrochées au substrat par une fonction chimique d'accrochage, les espèces chimiques comportant un groupe aldéhyde destiné à l'immobilisation desdites sondes, caractérisé en ce que le groupe aldéhyde est un groupe obtenu par oxydation d'un diol vicinal dépourvu d'atome d'oxygène en position β .

5. Support solide selon la revendication 4, caractérisé en ce que le substrat est en un matériau choisi parmi le verre, le silicium et le plastique.

5 6. Support solide selon l'une des revendications 4 ou 5, caractérisé en ce que ladite fonction chimique d'accrochage des espèces chimiques sur le support est une fonction silane.

10 7. Biopuce, caractérisée en ce qu'elle comprend un support solide selon l'une quelconque des revendications 4 à 6, des sondes oligonucléotidiques étant immobilisées sur les sites activés grâce à une liaison covalente entre les fonctions aldéhyde du support solide et des fonctions amine portées par les
15 sondes.

8. Procédé de fabrication d'un support solide présentant des sites destinés à l'immobilisation de sondes oligonucléotidiques, comprenant les étapes
20 suivantes :

- nettoyage d'une surface d'un substrat,
- définition desdits sites par mise en place, sur la surface nettoyée, d'espèces chimiques
25 accrochées au substrat par une fonction chimique d'accrochage, les espèces chimiques comportant un précurseur destiné à former une fonction aldéhyde permettant l'immobilisation des sondes, caractérisé en ce que le précurseur est une fonction
30 époxyde et est traité pour donner un groupe diol, le

précurseur époxyde étant dépourvu d'atome d'oxygène en position β du diol vicinal.

5 9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que le traitement pour donner un groupe diol est une hydrolyse de l'époxyde.

10 10. Procédé selon l'une des revendications 8 ou 9, caractérisé en ce que l'étape de nettoyage consiste à nettoyer une surface d'un substrat en un matériau choisi parmi le verre, le silicium et le plastique.

15 11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 8 à 10, caractérisé en ce que la fonction chimique d'accrochage des espèces chimiques sur le substrat est une fonction silane.

20 12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 8 à 11, caractérisé en ce qu'il comporte en outre une étape consistant à oxyder le diol vicinal pour obtenir un aldéhyde.

25 13. Procédé de fabrication d'une biopuce, caractérisé en ce qu'il consiste à :

- fabriquer un support solide présentant des sites destinés à l'immobilisation de sondes oligonucléotiques selon le procédé de la revendication 12,

30 - immobiliser des sondes oligonucléotiques par liaison covalente entre les fonctions

aldéhyde du support solide et des fonctions amine
portées par les sondes.

1/4

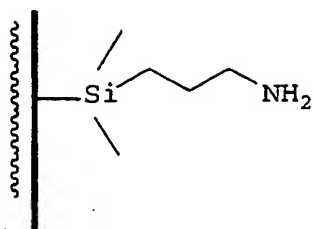


FIG. 1

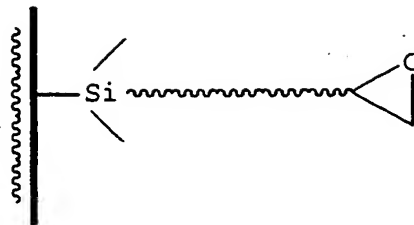


FIG. 2

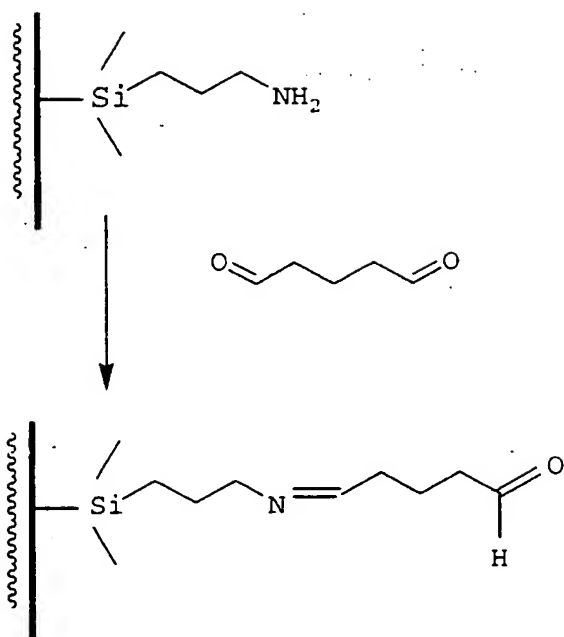


FIG. 3

2/4

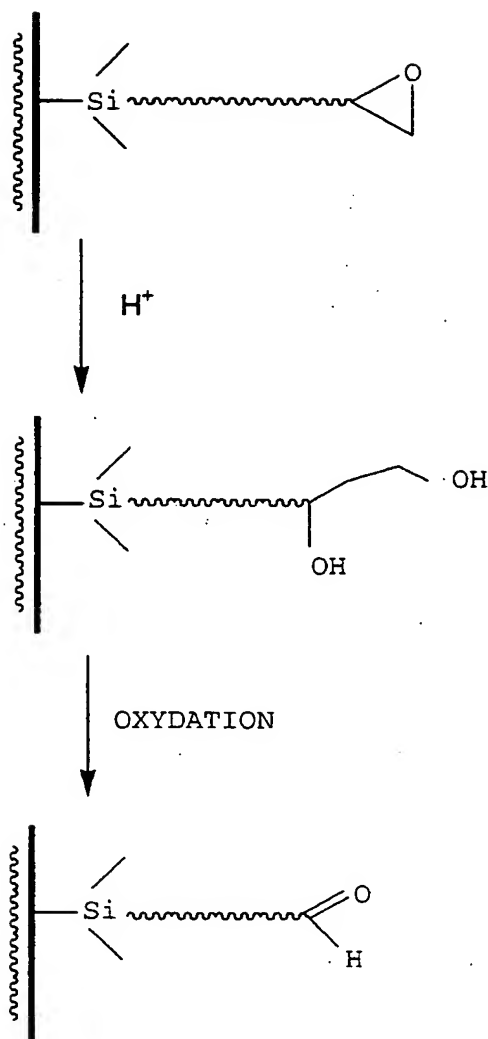


FIG. 4

3/4

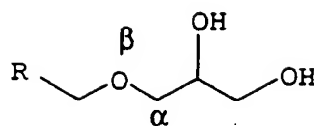


FIG. 5

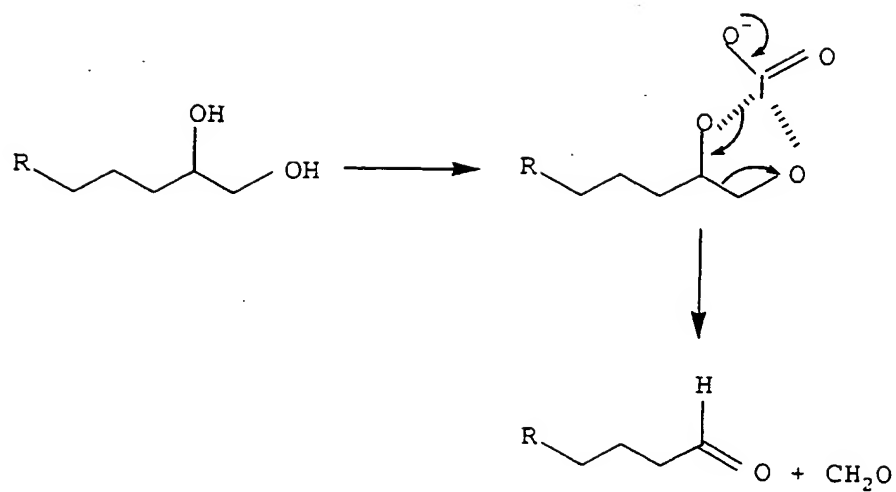


FIG. 6

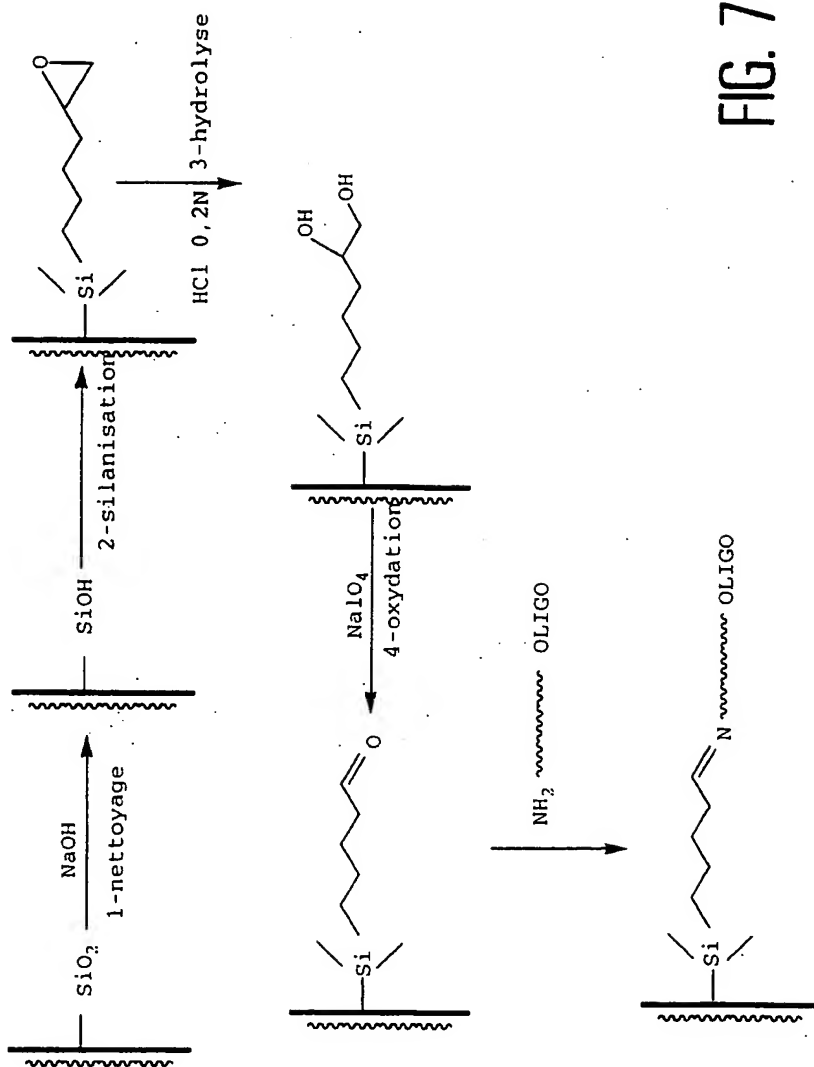


FIG. 7



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2818662

N° d'enregistrement
nationalFA 598630
FR 0016940

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	EP 0 127 438 A (NAT RES DEV) 5 décembre 1984 (1984-12-05) * page 10, schéma * * page 10 - page 12 *	1-7	C12Q1/68 G01N33/543
X	MASKOS U ET AL: "OLIGNUCLEOTIDE HYBRIDISATIONS ON GLASS SUPPORTS: A NOVEL LINKER FOR OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS AND HYBRIDISATION PROPERTIES OF OLIGNUCLEOTIDES SYNTHESISED IN SITU" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 20, no. 7, 1992, pages 1679-1684, XP000651031 ISSN: 0305-1048	1-3	
A	* page 1679, colonne de gauche * * page 1680, colonne de gauche, dernier alinéa - colonne de droite * * figures 1;2 *	8-11	
X	REDEMANN, THOMAS ET AL: "Synthesis of peptidomimetics using a polymer-bound Boc-linker" MOL. DIVERSITY (2000), VOLUME DATE 1998, 4(3), 191-197 , XP001015985 * page 191, colonne de droite, alinéa 2 * * page 193, schéma 5, composé 14 * * page 195 * * page 197, colonne de gauche, alinéa 1 - alinéa 2 *	4	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7) C07F C07C C07H G01N C12Q
-/-			
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
22 octobre 2001		Held, P	
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>			

RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 598630
FR 0016940

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	REGGELIN M ET AL: "Towards Polyketide Libraries-II: Synthesis of Chiral Aracemic Di- and Triketides on a Solid Support" TETRAHEDRON LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 39, no. 27, 2 juillet 1998 (1998-07-02), pages 4801-4804, XP004120761 ISSN: 0040-4039 * page 1, schéma 1 * * page 4802; tableau 1 *	4	
X	UKEDA, HIROYUKI ET AL: "Direct immobilization of NAD to Sepharose 4B by using the bifunctional reagent glutaraldehyde" AGRIC. BIOL. CHEM. (1989), 53(1), 235-7 , XP002180871	4,7	
A	* page 235 - page 236, colonne de gauche, alinéa 1 *	13	
X	WO 99 37630 A (GORDEEV MIKHAIL F ;GORDON ERIC (US); LUEHR GARY W (US); NI ZHI JIE) 29 juillet 1999 (1999-07-29) * figures 13,21,22,24,26,41,49 *	4	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (InCL.7)
X	US 5 958 792 A (DESAI MANOI C ET AL) 28 septembre 1999 (1999-09-28) * colonne 8, ligne 42 - ligne 67 * * colonne 9, ligne 59 - colonne 11, ligne 6 * * colonne 18, ligne 48 - ligne 67 *	4	
-/--			
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
22 octobre 2001		Held, P	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS			
X: particulièrement pertinent à lui seul Y: particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A: arrière-plan technologique O: divulgation non-écrite P: document intercalaire T: théorie ou principe à la base de l'invention E: document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D: cité dans la demande L: cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2818662

N° d'enregistrement
nationalFA 598630
FR 0016940

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	SMITH, AMOS B., III ET AL: "Synthesis of Polypyrrolinones on Solid Support" ORG. LETT. (2000), 2(14), 2041-2044 , XP002180872	1,4	
A	* page 2043 * * page 2043, scheme 3 (step 19->20)* * page 2044, scheme 5 (steps 14 -> 20) *	12	
X	WO 81 01860 A (BEGHIN SAY SA ; MONSAN P (FR)) 9 juillet 1981 (1981-07-09)	7	
A	* page 8 - page 9 * * revendication 1 *	8,12,13	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int. CL.7)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
22 octobre 2001		Held, P	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS			
<p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons</p> <p>& : membre de la même famille, document correspondant</p>			

1
EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)